



УТВЕРЖДАЮ

Директор

ООО «БИОЛИНК»

Корниенко А.А.



«30» ноября 2021 г.

Набор реагентов для выявления мутаций
в 12-м, 13-м и 61-м кодонах гена *NRAS*
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)
в режиме реального времени
"Real-time-PCR-NRAS-3R"
по ТУ 21.20.23-003-57201404-2020

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Содержание

Введение	3
Варианты исполнения	3
1 Назначение набора	3
2 Характеристика набора	4
2.1 Состав набора реагентов	4
2.2 Число анализируемых проб	4
2.3 Принцип действия набора	5
3 Аналитические и диагностические характеристики набора	7
3.1 Предел обнаружения	7
3.2 Аналитическая специфичность, влияние потенциально интерферирующих веществ	7
3.3 Характеристики аналитической эффективности	7
3.4 Диагностическая специфичность	8
3.5 Диагностическая чувствительность	8
3.6 Ограничения при применении	8
3.7 Доступные референтные материалы и методы анализа	8
4 Меры предосторожности	8
5 Оборудование и материалы	10
5.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов	10
5.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов	10
6 Анализируемые пробы	11
7 Подготовка компонентов для анализа	11
7.1 Подготовка образцов – обработка урацил-ДНК-гликозилазой	11
7.2 Подготовка образцов – приготовление разведений	12
8 Проведение анализа	13
8.1 Приготовление смеси для контрольной ПЦР	13
8.2 Программирование и запуск термоциклера CFX96	14
8.3 Анализ результатов контрольной ПЦР	15
8.4 Приготовление смесей для контрольной ПЦР и для ПЦР на мутации гена NRAS	16
8.5 Программирование и запуск термоциклера CFX96	18
9 Анализ результатов	18
9.1 Критерии достоверности результатов ПЦР	18
9.2 Анализ результатов ПЦР на наличие мутаций гена NRAS	20

10	Условия хранения, транспортирования и эксплуатации	22
10.1	Условия хранения.....	22
10.2	Условия транспортирования.....	22
10.3	Условия эксплуатации	22
11	Гарантийные обязательства	23
12	Маркировка	23
	Библиография	24
	Приложение А (справочное) Список мутаций 12-го, 13-го и 61-го кодона гена <i>NRAS</i> согласно базе данных COSMIC.....	25
	Приложение Б (рекомендуемое) Рекомендации по выделению ДНК из парафиновых блоков	26
	Приложение В (рекомендуемое) Рекомендации по анализу данных в программе «MS Office Excel»	27

Введение

Ген *NRAS* кодирует внутриклеточный белок – компонент сигнальных каскадов RAS-MAPK и RAS-MEK-ERK, контролирующих пролиферацию и дифференциацию клеток в ответ на внешние митогенные стимулы [1].

Активирующие соматические мутации гена *NRAS* приводят к постоянной гиперактивации внутриклеточных сигнальных путей. Мутации в гене *NRAS* выявляются при меланоме кожи (~23%), при раке щитовидной железы (~12%), остром лимфобластном лейкозе (~14%), острой миелоидной лейкемии (~10%), раке прямой кишки (~5%), раке лёгкого (~1%). Наиболее часто встречаются мутации 61-го кодона гена *NRAS*, более редко – мутации 12-го и 13-го кодонов этого гена. Совокупно мутации в 12-м, 13-м и 61-м кодонах гена *NRAS* составляют 90,3% всех мутаций или 98,8% клинически значимых мутаций этого гена [2].

Наличие мутаций в гене *NRAS* ассоциировано с резистентностью к терапии анти-EGFR антителами (цетуксимаб и панитумумаб) у пациентов с метастатическим раком прямой кишки [3]. Таким пациентам рекомендовано выполнять анализ на мутации гена *NRAS* для определения дальнейшей тактики лечения. Пациентам, имеющим мутации в гене *NRAS*, противопоказано назначение моноклональных анти-EGFR антител [4, 5, 6].

Варианты исполнения

«Набор реагентов для выявления мутаций в 12-м, 13-м и 61-м кодонах гена *NRAS* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени "Real-time-PCR-NRAS-3R" по ТУ 21.20.23-003-57201404-2020» (далее по тексту – набор реагентов) представлен в двух вариантах исполнения:

- 1) Набор реагентов на 12 реакций "Real-time-PCR-NRAS-3R (12)";
- 2) Набор реагентов на 36 реакций "Real-time-PCR-NRAS-3R (36)".

1 Назначение набора

Набор реагентов предназначен для качественного определения мутаций в 12-м, 13-м и 61-м кодонах (G12X, G13X и Q61X) гена *NRAS* методом ПЦР в режиме реального времени с подавлением амплификации ДНК дикого типа. Материалом для проведения ПЦР является ДНК, выделенная из фиксированной формалином и заключенной в парафин (FFPE) опухолевой ткани. Результаты анализа на мутации гена *NRAS* влияют на выбор таргетного препарата в лечении метастатического рака прямой кишки. Пациентам с мутацией в гене *NRAS* не рекомендовано назначение

моноклональных анти-EGFR антител (цетуксимаб и панитумумаб). Для проведения ПЦР используется «Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями» исполнения: «C1000 Touch» с модулем реакционным оптическим CFX96 (Optical Reaction Module CFX96) (производства Bio-Rad Laboratories, Inc., США). Набор реагентов предназначен для диагностики *in vitro*.

2 Характеристика набора

2.1 Состав набора реагентов

Набор содержит пробирки с реагентами (таблица 1), инструкцию по применению и паспорт качества.

Таблица 1. Состав набора реагентов

№	Цвет крышки	Наименование реагента	Объём реагента	
			на 12 реакций	на 36 реакций
1	Зелёный	Контрольная ПЦР-смесь	740 мкл	2*1100 мкл
2	Жёлтый	ПЦР-смесь G12/13X	280 мкл	840 мкл
3	Жёлтый	ПЦР-смесь Q61X	280 мкл	840 мкл
4	Синий	Taq ДНК-полимераза	25 мкл	55 мкл
5	Красный	ПКО ¹	90 мкл	270 мкл
6	Белый	ОКО ²	1400 мкл	4000 мкл
7	Бесцветный	10x UDG буфер	36 мкл	110 мкл
8	Бесцветный	UDG (урацил-ДНК-гликозилаза)	9 мкл	27 мкл

1) ПКО – положительный контрольный образец, содержащий 5% ДНК рекомбинантных плазмид с фрагментами гена *NRAS* с мутациями Q61R, G12D на фоне ДНК человека с геном *NRAS* без мутаций в 12-м, 13-м и 61-м кодонах;

2) ОКО – отрицательный контрольный образец, содержащий воду без нуклеаз.

Компоненты набора в рабочих концентрациях не токсичны, не обладают канцерогенным и мутагенным действием.

2.2 Число анализируемых проб

Набор реагентов на 12 реакций "Real-time-PCR-NRAS-3R (12)" содержит реактивы для проведения 12 реакций, что позволяет проанализировать в одной постановке четыре клинических образца, положительный и отрицательный контроль (все образцы в двух повторях).

Набор реагентов на 36 реакций "Real-time-PCR-NRAS-3R (36)" содержит реактивы для проведения 36 реакций, что позволяет проанализировать 12 клинических образцов в трёх постановках по четыре клинических образца с

положительным и отрицательным контролем (все образцы в двух повторях) или 14 клинических образцов с положительным и отрицательным контролем в одной постановке (все образцы в двух повторях).

2.3 Принцип действия набора

Принцип действия набора реагентов основан на методе ПЦР в режиме реального времени с подавлением амплификации ДНК дикого типа.

Набор содержит 3 смеси для ПЦР: контрольная ПЦР-смесь, ПЦР-смесь G12/13X для выявления мутаций 12-го и 13-го кодонов гена *NRAS* и ПЦР-смесь Q61X для выявления мутаций 61-го кодона гена *NRAS*.

В контрольной ПЦР происходит амплификация участка 3-го экзона гена *NRAS*. Продукты ПЦР гена *NRAS* детектируют в 5'-экзонуклеазной реакции с помощью TaqMan зонда, меченного флуорофором FAM. Контрольная ПЦР-смесь также содержит реагенты для ПЦР внутреннего контроля (ВК). Мишенью ПЦР ВК является синтетическая последовательность, не имеющая гомологии с геномом человека. Продукты ПЦР ВК детектируют в 5'-экзонуклеазной реакции с помощью TaqMan зонда, меченного флуорофором ROX. Амплификация ВК служит контролем правильности постановки и отсутствия ингибиторов ПЦР, которые могут приводить к ложноотрицательным результатам.

ПЦР-смеси G12/13X и Q61X содержат реагенты для амплификации участков 2-го и 3-го экзонов гена *NRAS* в присутствии олигонуклеотидов-блокеров, подавляющих амплификацию ДНК с кодонами дикого типа в положениях 12, 13 или 61 относительно белка *NRAS*. ПЦР-смеси содержат все необходимые реагенты за исключением Taq ДНК полимеразы, поставляемой в отдельной пробирке.

Для контроля работы набора в его состав входят положительный контрольный образец (ПКО) и отрицательный контрольный образец (ОКО). ПКО содержит 5% ДНК рекомбинантных плазмид с фрагментами гена *NRAS* с мутациями Q61R, G12D на фоне ДНК рекомбинантной плазмиды с фрагментом гена *NRAS* без мутаций. ОКО содержит воду без нуклеаз.

В каждом эксперименте используют ПКО и ОКО. Все исследуемые и контрольные образцы тестируют в двух повторях.

Анализ на наличие мутации в гене *NRAS* состоит из двух этапов:

- 1) проверка образцов ДНК в контрольной ПЦР;
- 2) ПЦР на наличие мутаций в гене *NRAS*.

На первом этапе проводят ПЦР с контрольной смесью для оценки пригодности и выбора подходящего разведения образцов ДНК. Пригодность образца ДНК

оценивают по величине C_t , соответствующей количеству циклов ПЦР, при котором кривая флуоресценции пересекает заданный пороговый уровень. Значения C_t разведений клинических образцов ДНК сравнивают с C_t ПКО. Для последующих ПЦР выбирают разведение образца ДНК, которое имеет наиболее близкую величину C_t относительно C_t ПКО.

На втором этапе ДНК с выбранными разведениями анализируют одновременно ещё раз в контрольной ПЦР и в ПЦР с подавлением амплификации гена *NRAS* дикого типа. В ПЦР со смесью G12/13X происходит амплификация участка 2-го экзона гена *NRAS*, в ПЦР со смесью Q61X происходит амплификация участка 3-го экзона гена *NRAS*. ПЦР-смеси G12/13X и Q61X содержат олигонуклеотиды-блокеры, которые имеют последовательность ДНК дикого типа для 12-го, 13-го и 61-го кодонов гена *NRAS* и модифицированные нуклеотиды, повышающие температуру плавления. Олигонуклеотиды-блокеры прочно связываются с ДНК гена *NRAS* дикого типа и подавляют её амплификацию. Если в любом из этих участков есть мутация, то блокеры связываются не прочно, в результате амплификация подавляется незначительно или совсем не подавляется. Список возможных мутаций 12-го, 13-го и 61-го кодона гена *NRAS* согласно базе данных COSMIC приведён в приложении А.

Наличие мутаций в 12-м и 13-м кодонах гена *NRAS* определяется по разнице между значениями C_t в ПЦР со смесью G12/13X и в контрольной ПЦР. Наличие мутаций в 61-м кодоне гена *NRAS* определяется по разнице между значениями C_t в ПЦР со смесью Q61X и в контрольной ПЦР.

3 Аналитические и диагностические характеристики набора

3.1 Предел обнаружения

Предел обнаружения составляет 5% ДНК с мутацией в 61-м кодоне гена *NRAS* на фоне ДНК гена *NRAS* без мутаций, 5% ДНК с мутацией в 12-м или 13-м кодоне гена *NRAS* на фоне ДНК гена *NRAS* без мутаций.

Минимальное количество ДНК, необходимое для проведения анализа, составляет 40 мкл с концентрацией 1,8 нг/мкл (600 копий гена *NRAS* в 1 мкл).

3.2 Аналитическая специфичность, влияние потенциально интерферирующих веществ

Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации для образцов ДНК, несущих ген *NRAS* без мутаций.

Потенциально интерферирующие вещества: гемоглобин (2 мг/мл), ксилол (5%), этанол (5%) – не влияют на результаты определения мутаций в 12-м, 13-м и 61-м кодонах гена *NRAS*.

Содержание парафина без ткани на срезе от 59% до 79% не влияет на результаты определения мутаций в 12-м, 13-м и 61-м кодонах гена *NRAS*. Содержание некротической ткани на срезе от 5% до 50% не влияет на результаты определения мутаций в 12-м, 13-м и 61-м кодонах гена *NRAS*.

3.3 Характеристики аналитической эффективности

Повторяемость оценивали в условиях, при которых независимые результаты испытаний получают одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, одним оператором, в пределах короткого промежутка времени. Значение повторяемости результатов при определении мутаций в 12-м и 13-м кодоне гена *NRAS* составило 100%, при определении мутаций в 61-м кодоне гена *NRAS* составило 100% (интервал 94,04-100% с доверительной вероятностью 95%).

Воспроизводимость оценивали в условиях, при которых результаты испытаний получают одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, двумя операторами, с использованием различного оборудования, в разные дни. Значение воспроизводимости результатов при определении мутаций в 12-м и 13-м кодоне гена *NRAS* составило 100%, при определении мутаций в 61-м кодоне гена *NRAS* составило 100% (интервал 97,97-100% с доверительной вероятностью 95%).

3.4 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность набора реагентов при выявлении мутаций в 12-м, 13-м и 61-м кодонах гена *NRAS* в клинических испытаниях на выборке из 58 образцов составила 100% (интервал 89,57-100% с доверительной вероятностью 95%).

3.5 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность набора реагентов при выявлении мутаций в 12-м, 13-м и 61-м кодонах гена *NRAS* в клинических испытаниях на выборке из 58 образцов составила 100% (интервал 86,68-100% с доверительной вероятностью 95%).

3.6 Ограничения при применении

Для уменьшения риска ложноотрицательных результатов необходимо использовать срезы FFPE ткани, содержащие не менее 30% опухолевых клеток по площади. Пригодность ДНК для анализа на наличие мутаций гена *NRAS* оценивается по значению *Ct* в контрольной ПЦР. Если концентрация ДНК не достаточна, то результаты анализа не валидны. Необходимо провести повторный анализ, начиная с этапа выделения ДНК из срезов FFPE опухолевой ткани.

3.7 Доступные референтные материалы и методы анализа

Референтный метод анализа на наличие мутаций гена *NRAS* – секвенирование по Сэнгеру. Референтные материалы отсутствуют.

4 Меры предосторожности

4.1 Класс потенциального риска применения набора реагентов – 2б согласно Приказу МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н.

4.2 Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.

4.3 Применять набор реагентов строго по назначению, согласно настоящей инструкции.

4.4 Работу следует проводить в ПЦР-боксе биобезопасности II класса защиты.

4.5 Во избежание риска контаминации проводить выделение образцов ДНК и постановку ПЦР в отдельных помещениях (зонах). Не возвращать образцы, реагенты и оборудование в зону, в которой была проведена предыдущая стадия.

4.6 При работе с набором реагентов использовать лабораторную одежду и одноразовые медицинские перчатки. Тщательно вымыть руки по окончании работы.

- 4.7 Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.
- 4.8 При постановке ПЦР использовать и менять после каждой операции одноразовые наконечники с фильтром для автоматических дозаторов. Использованные наконечники и пробирки сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство для обеззараживания медицинских отходов.
- 4.9 Использовать только Taq ДНК-полимеразу, входящую в состав набора.
- 4.10 Не использовать компоненты наборов реагентов из разных серий.
- 4.11 Не использовать набор реагентов по истечении срока годности, при нарушении условий транспортировки или хранения.
- 4.12 Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- 4.13 Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно следует подвергать влажной уборке с применением дезинфицирующих средств, регламентированных санитарными правилами СанПиН 3.3686-21.
- 4.14 Все рабочие зоны следует подвергать ежедневному обеззараживанию ультрафиолетовым излучением в соответствии с Р 3.5.1904-04 «Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях».
- 4.15 Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, биологический материал и упаковку подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией согласно СанПиН 2.1.3684-21. **ВНИМАНИЕ!** При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, реагентов и оборудования.
- 4.16 Паспорта безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

5 Оборудование и материалы

5.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов

Бокс абактериальной воздушной среды для работы с ДНК-пробами при проведении ПЦР-диагностики БАВ-ПЦР-"Ламинар-С." (ЗАО «Ламинарные системы», Россия) или аналогичное оборудование.

Вортекс персональный V-1 plus (ООО «Биосан», Латвия) или аналогичное оборудование.

Дозаторы пипеточные, одно- и многоканальные, «Блэк» по ТУ 9443-008-33189998-2009 (АО «Термо Фишер Сайентифик», Россия) или аналогичное оборудование.

Компьютер с операционной системой Windows XP Professional SP3 или Windows 7 и выше, жёстким диском не менее 10 ГБ, тактовой частотой процессора не менее 2.0 ГГц, оперативной памятью не менее 1 ГБ, разрешением экрана не менее 1024*768, программным обеспечением Microsoft Office Excel версии 2003 или выше.

Термостат типа "Драй-блок" TDB-120 (ООО «Биосан», Латвия) или аналогичное оборудование.

Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями исполнения: «C1000 Touch» с модулем реакционным оптическим CFX96 (Optical Reaction Module CFX96) («Био-Рад Лабораториз, Инк.», США).

Холодильник бытовой с холодильной (от 2°C до 8°C) и морозильной камерами (от минус 18°C до минус 25°C) (например, ATLANT XM-6023-031 «ATLANT», Белоруссия).

Центрифуга медицинская лабораторная LMC-3000 с принадлежностями: ротор R-2, ротор R-6, ротор R-12/10, ротор R-12/15 (ООО «Биосан», Латвия) или аналогичное оборудование.

5.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов

Контейнер для сброса отходов («КМ-ПРОЕКТ», Россия) или аналогичный.

Микроцентрифужные пробирки градуированные объёмом 0,6 мл и 1,5 мл («Эксиджен, Инк.», США) или аналогичные.

Набор реагентов для выделения ДНК из срезов тканей, заключённых в парафиновые блоки, зарегистрированный на территории РФ (например, «ЭкстрактДНК FFPE набор реагентов для выделения ДНК человека из срезов с FFPE-блоков для диагностики *in vitro*» по ТУ 9398-001-11248074-2017, РЗН 2019/9172 от 14.04.2020).

Наконечники универсальные для дозаторов с фильтром объемом от 0,1 мкл до 1000 мкл («Эксиджен, Инк.», США) или аналогичные.

Перчатки нитриловые неопудренные нестерильные («ТГ Медикал Сдн. Бхд.», Малайзия) или аналогичные.

Пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 штук или плашки для ПЦР на 96 лунок («Корнинг Инк.», США) или аналогичные.

Штатив для пробирок, 80 ячеек и/или штатив для пробирок, 96 ячеек («Эксиджен, Инк.», США) или аналогичные.

6 Анализируемые пробы

В качестве материала для проведения ПЦР используют клинические образцы ДНК, выделенные из фиксированной формалином и заключенной в парафин (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE) опухолевой ткани. В набор не входят реагенты для выделения ДНК.

Для выделения ДНК из срезов FFPE тканей используют зарегистрированные в РФ наборы реагентов, рекомендуемый набор: «Экстракт ДНК FFPE набор реагентов для выделения ДНК человека из срезов с FFPE-блоков для диагностики *in vitro*» по ТУ 9398-001-11248074-2017, РЗН 2019/9172 от 14.04.2020. Рекомендации по выделению ДНК из парафиновых блоков приведены в приложении Б.

ВНИМАНИЕ! Для уменьшения риска ложноотрицательных результатов необходимо использовать срезы FFPE ткани, содержащие не менее 30% опухолевых клеток.

Выделенные образцы ДНК хранить с соблюдением условий согласно требованиям инструкции используемого набора для выделения ДНК и с соблюдением мер, предотвращающих контаминацию образцов чужеродной ДНК.

7 Подготовка компонентов для анализа

7.1 Подготовка образцов – обработка урацил-ДНК-гликозилазой

Обработка образцов ДНК, выделенных из FFPE опухолевой ткани, урацил-ДНК-гликозилазой (UDG) улучшает специфичность анализа на наличие соматических мутаций.

7.1.1 Разморозить ОКО (пробирка №6, белая крышка), 10x UDG буфер (пробирка №7, бесцветная крышка) и образцы ДНК, перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 3 секунд, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок.

7.1.2 Приготовить UDG-смесь: добавить в пробирку объёмом 1,5 мл ОКО, 10х UDG буфер и UDG (пробирка №8, бесцветная крышка) и перемешать пипетированием 8-10 раз (не использовать вортекс). Количество реагентов на один образец ДНК приведено в таблице 2, для тестирования N клинических образцов ДНК указанное количество необходимо умножить на (N+1).

Таблица 2. Состав UDG-смеси

Реагент	Количество на 1 образец ДНК
ОКО	5 мкл
10х UDG буфер	4 мкл
UDG (Урацил-ДНК-гликозилаза)	1 мкл

7.1.3 Добавить в пробирки объёмом 1,5 мл по 10 мкл UDG-смеси, по 40 мкл образцов ДНК и перемешать пипетированием 8-10 раз (не использовать вортекс). Центрифугировать в течение 3 секунд на микроцентрифуге, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок.

7.1.4 Поместить пробирки в термостат и инкубировать в течение 30 минут при температуре 37°C. После этого прогреть в течение 5 минут при температуре 95°C, чтобы инактивировать UDG, и центрифугировать в течение 3 секунд. ДНК, обработанную UDG, хранить не более суток при температуре 4°C или в течение 6 месяцев при температуре минус 20°C.

7.2 Подготовка образцов – приготовление разведений

Необходимая степень разведения образцов ДНК зависит от количества ткани, взятой для выделения ДНК, и от концентрации ингибирующих примесей. При использовании рекомендаций по выделению ДНК (Приложение Б) для большинства образцов достаточно разведение в 5-20 раз, поэтому сначала рекомендуется тестировать все образцы в разведениях 1/5 и 1/20.

7.2.1 Приготовить две микропробирки объёмом 1,5 мл для каждого образца ДНК. Промаркировать пробирки «1/5» и «1/20» соответственно.

7.2.2 В каждую пробирку добавить ОКО и образец ДНК согласно таблице 3.

Таблица 3. Разведение образцов ДНК

Разведение	Количество ДНК	Количество ОКО
1/5	30 мкл	120 мкл
1/20	10 мкл	190 мкл

7.2.3 Перемешать на вортексе в течение 2-3 сек, центрифугировать в течение 5-10 секунд, чтобы собрать жидкость на дне пробирок. Разведенную ДНК хранить не более суток при температуре 4°C или не более 6 месяцев при температуре минус 20°C.

8 Проведение анализа

8.1 Приготовление смеси для контрольной ПЦР

8.1.1 Рассчитать необходимое количество ПЦР-смеси и Taq ДНК-полимеразы для тестирования клинических образцов ДНК, ПКО и ОКО с учётом погрешности при пипетировании. Состав реакционной смеси на одну реакцию приведен в таблице 4, для тестирования N клинических образцов ДНК в двух разведениях в дублях указанное количество необходимо умножить на $(4N + 5)$.

Таблица 4. Количество реагентов на одну реакцию

Реагент	Количество
ПЦР-смесь (без полимеразы)	19,8 мкл
Taq ДНК-полимераза	0,2 мкл

8.1.2 Контрольную ПЦР-смесь (пробирка №1, зелёная крышка), ПКО (пробирка №5, красная крышка) и ОКО (пробирка №6, белая крышка) разморозить при комнатной температуре (от 18°C до 25°C) или при 37°C, убедиться, что раствор полностью растаял. Содержимое пробирки перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 секунд, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирки.

8.1.3 Приготовить реакционную смесь в пробирке объёмом 1,5 мл согласно расчёту (пункт 8.1.1): внести в пробирку расчётное количество контрольной ПЦР-смеси, добавить Taq ДНК-полимеразу (пробирка №4, синяя крышка) и тщательно перемешать пипетированием (не использовать вортекс). Реакционная смесь готова.

ВНИМАНИЕ! Использовать ПЦР-смесь немедленно, время нахождения ПЦР-смеси при комнатной температуре – не более 10 минут. Неиспользованные остатки исходной ПЦР-смеси и Taq ДНК-полимеразы сразу поместить в морозильную камеру с температурой минус 20°C.

8.1.4 Подготовить и промаркировать стрипы или плашки для ПЦР на 96 лунок.

ВНИМАНИЕ! Во избежание загрязнения оптики термоциклера не маркировать стрипы на крышках!

Пример расположения шести клинических образцов ДНК и контрольных образцов в дублях с использованием стрипов по восемь пробирок приведён на рисунке 1.

Разведение	Клинические образцы ДНК						Образцы из набора	
	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
1:5	ДНК1 1:5	ДНК2 1:5	ДНК3 1:5	ДНК4 1:5	ДНК5 1:5	ДНК6 1:5	ОКО	ПКО
	ДНК1 1:5	ДНК2 1:5	ДНК3 1:5	ДНК4 1:5	ДНК5 1:5	ДНК6 1:5	ОКО	ПКО
1:20	ДНК1 1:20	ДНК2 1:20	ДНК3 1:20	ДНК4 1:20	ДНК5 1:20	ДНК6 1:20		
	ДНК1 1:20	ДНК2 1:20	ДНК3 1:20	ДНК4 1:20	ДНК5 1:20	ДНК6 1:20		

Рисунок 1. Схема расположения шести образцов ДНК в двух разведениях в дублях при использовании стрипов по восемь пробирок.

Указаны номера образцов ДНК, ПКО, ОКО и разведение (1:5; 1:20).

8.1.5 Добавить в пробирки по 20 мкл готовой реакционной смеси с Taq ДНК-полимеразой и закрыть крышки.

8.1.6 Добавить в пробирки с готовой реакционной смесью:

- по 5 мкл клинических образцов ДНК в соответствующие пробирки;
- по 5 мкл ОКО в пробирки для отрицательного контроля;
- по 5 мкл ПКО в пробирки для положительного контроля.

Каждую пробирку открывать перед добавлением образца и закрывать сразу после добавления.

8.1.7 Легко перемешать содержимое пробирок, постукивая по стенке (не использовать вортекс).

8.1.8 Центрифугировать 3 мин при 2000 об/мин, чтобы собрать всю жидкость на дне.

8.1.9 Установить стрипы в блок термоциклера.

8.2 Программирование и запуск термоциклера CFX96

8.2.1 Запрограммировать термоциклер для проведения ПЦР и детекции флуоресценции в соответствии с руководством по эксплуатации и п. 8.2.2-8.2.4.

8.2.2 Задать объем реакционной смеси 25 мкл. Запрограммировать протокол проведения ПЦР в соответствии с таблицей 5.

Таблица 5. Протокол ПЦР в реальном времени

Количество циклов	Этап	Температура	Время	Измерение флуоресценции
1	Первичная активация	95°C	3 мин	Нет
10	Денатурация	95°C	15 сек	
	Отжиг праймеров, элонгация	55°C	40 сек	
30	Денатурация	95°C	15 сек	Да
	Отжиг праймеров, элонгация	55°C	40 сек	

8.2.3 Выбрать каналы для регистрации флуоресценции:

- ROX – регистрация сигнала при амплификации ДНК ВК;
- FAM – регистрация сигнала при амплификации фрагмента гена *NRAS*.

8.2.4 Запрограммировать положение пробирок с клиническими и контрольными образцами.

8.2.5 Запустить протокол ПЦР.

8.3 Анализ результатов контрольной ПЦР

8.3.1 Открыть окно анализа данных ПЦР. Для каждого образца определить значение порогового цикла (C_t) – цикла амплификации, в котором кривая флуоресценции данного образца пересекает пороговый уровень (threshold level). Для получения величин C_t использовать логарифмическую шкалу и выставить вручную пороговый уровень 100.

Примечание: экспоненциальная фаза соответствует линейному участку на графике кривой флуоресценции в логарифмической шкале.

8.3.2 Проверить величины C_t по каналам FAM и ROX для ПКО и ОКО (таблица 6, раздел таблицы «ПЦР с контрольной смесью»). Результаты ПЦР считаются достоверными и могут быть использованы для анализа на наличие мутаций гена *NRAS* только в том случае, если величины C_t для ПКО и ОКО имеют допустимые значения:

- для ОКО наблюдается нарастание флуоресценции по каналу ROX и определяется значение C_{tROX} меньше или равно Q_{CROX} (указано на наклейке на упаковке набора);
- для ОКО не наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и не определяется значение C_{tFAM} либо C_{tFAM} больше $C_{tПКО}+6$ ($C_{tПКО}$ – C_t ПКО в контрольной ПЦР);
- для ПКО наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и определяется значение $C_{tПКО}$ меньше или равно Q_{CFAM} (контрольная ПЦР) (указано на упаковке набора и в паспорте).

Если величины C_t контрольных образцов выходят за пределы допустимых значений, то необходимо повторить анализ.

8.3.3 Сравнить величины C_t по каналу FAM для каждого разведения клинических образцов (C_{tC}) и C_t ПКО ($C_{tПКО}$). Для проведения аллель-специфичной ПЦР выбрать разведение образца, имеющее значение C_{tC} , наиболее близкое к $C_{tПКО}$.

8.3.4 Если значение C_{tC} определяется в диапазоне $C_{tПКО}-4 \leq C_{tC} \leq C_{tПКО}+4$, то концентрация ДНК оптимальна для анализа на наличие мутаций гена *NRAS*.

8.3.5 Если значение C_{tC} меньше $C_{tПКО}-4$, то необходимо развести ДНК, принимая, что двукратное разведение увеличивает C_t на 1 цикл, и повторить анализ.

8.3.6 Если значение C_{tC} больше $C_{tПКО}+4$, то концентрация ДНК не достаточна для анализа на наличие мутаций гена *NRAS*. Необходимо провести повторный анализ, начиная с этапа выделения ДНК.

8.4 Приготовление смесей для контрольной ПЦР и для ПЦР на мутации гена *NRAS*

8.4.1 Рассчитать необходимое количество ПЦР-смесей и Taq ДНК-полимеразы для тестирования клинических образцов ДНК, ПКО и ОКО. Состав реакционной смеси на 1 реакцию приведен в таблице 4, для тестирования N клинических образцов в дублях это количество необходимо умножить на $(2N + 5)$.

8.4.2 Разморозить при комнатной температуре (от 18°C до 25°C) или при 37°C контрольную ПЦР-смесь (пробирка №1, зелёная крышка), ПЦР-смесь G12/13X (пробирка №2, жёлтая крышка), ПЦР-смесь Q61X (пробирка №3, жёлтая крышка), ПКО (пробирка №5, красная крышка) и ОКО (пробирка №6, белая крышка), убедиться, что растворы полностью растаяли. Содержимое пробирок перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 секунд, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок.

8.4.3 Промаркировать три чистые пробирки объёмом 1,5 мл для реакционных смесей. Внести в пробирку №1 контрольную ПЦР-смесь, в пробирку №2 – ПЦР-смесь G12/13X, в пробирку №3 – ПЦР-смесь Q61X. Добавить в каждую пробирку для реакционных смесей Taq ДНК-полимеразу (пробирка №4, синяя крышка). Перемешать пипетированием 8-10 раз (не использовать вортекс) и центрифугировать в течение 5 секунд, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок. Реакционные смеси готовы.

ВНИМАНИЕ! Использовать немедленно, время нахождения ПЦР-смеси при комнатной температуре – не более 10 минут. Неиспользованные остатки исходных

ПЦР-смесей и Taq ДНК-полимеразы сразу поместить в морозильную камеру с температурой минус 20°C.

8.4.4 Подготовить и промаркировать стрипы или плашки для ПЦР на 96 лунок.

ВНИМАНИЕ! Во избежание загрязнения оптики термоциклера не маркировать стрипы на крышках!

Пример расположения клинических и контрольных образцов при анализе шести образцов ДНК в дублях с использованием стрипов по восемь пробирок приведен на рисунке 2.

ПЦР-смесь	Клинические образцы ДНК						Образцы из набора	
	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
Контрольная	ДНК1 К	ДНК2 К	ДНК3 К	ДНК4 К	ДНК5 К	ДНК6 К	ОКО К	ПКО К
	ДНК1 К	ДНК2 К	ДНК3 К	ДНК4 К	ДНК5 К	ДНК6 К	ОКО К	ПКО К
G12/13X	ДНК1 G	ДНК2 G	ДНК3 G	ДНК4 G	ДНК5 G	ДНК6 G	ОКО G	ПКО G
	ДНК1 G	ДНК2 G	ДНК3 G	ДНК4 G	ДНК5 G	ДНК6 G	ОКО G	ПКО G
Q61X	ДНК1 Q	ДНК2 Q	ДНК3 Q	ДНК4 Q	ДНК5 Q	ДНК6 Q	ОКО Q	ПКО Q
	ДНК1 Q	ДНК2 Q	ДНК3 Q	ДНК4 Q	ДНК5 Q	ДНК6 Q	ОКО Q	ПКО Q

Рисунок 2. Схема расположения шести образцов ДНК и контрольных образцов в дублях при использовании стрипов по восемь пробирок.

Указаны номера образцов ДНК, ПКО, ОКО и ПЦР-смеси:

К – контрольная смесь, G – ПЦР-смесь G12/13X, Q – ПЦР-смесь Q61X.

8.4.5 Добавить в стрипы по 20 мкл реакционной смеси с Taq ДНК-полимеразой в соответствии со схемой и закрыть крышки.

8.4.6 Добавить в пробирки с готовой реакционной смесью:

- по 5 мкл ДНК клинических образцов, используя оптимальные разведения, определённые на этапе контрольной ПЦР;
- по 5 мкл ОКО в пробирки для воды;
- по 5 мкл ПКО в пробирки для положительного контроля.

Каждую пробирку открывать перед добавлением образца и закрывать сразу после добавления.

8.4.7 Перемешать содержимое пробирок, постукивая по стенке (не использовать вортекс).

8.4.8 Центрифугировать 3 мин при 2000 об/мин, чтобы собрать всю жидкость на дне.

8.4.9 Установить стрипы в блок термоциклера.

8.5 Программирование и запуск термоциклера CFX96

8.5.1 Программирование и запуск прибора проводить в соответствии с руководством по эксплуатации, п. 8.2.2-8.2.4 и таблицей 5.

9 Анализ результатов

9.1 Критерии достоверности результатов ПЦР

9.1.1 Открыть окно анализа данных ПЦР. Для получения величин C_t использовать логарифмическую шкалу графика флуоресценции и выставить пороговый уровень как описано в разделе 8.3.1.

9.1.2 Проверить значения C_t по каналам ROX и FAM последовательно для ОКО, ПКО и клинических образцов ДНК.

9.1.3 Результаты ПЦР считаются достоверными и могут быть использованы для анализа на наличие мутаций гена *NRAS* только в том случае, если величины C_t для ОКО, ПКО имеют допустимые значения (таблица 6):

- для ОКО в контрольной ПЦР наблюдается нарастание флуоресценции по каналу ROX и определяется значение $C_{t_{ROX}}$ меньше или равно $Q_{C_{ROX}}$;

- для ОКО во всех ПЦР не наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и не определяется значение $C_{t_{FAM}}$ либо $C_{t_{FAM}}$ больше $C_{t_{ПКО}}+6$ ($C_{t_{ПКО}} - C_t$ ПКО в контрольной ПЦР);

- для ПКО в контрольной ПЦР наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и определяется значение $C_{t_{ПКО}}$ меньше или равно $Q_{C_{FAM}}$ (контрольная ПЦР), в ПЦР со смесями G12/13X и Q61X наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и определяется значение $C_{t_{ПКО}}$ меньше или равно $Q_{C_{FAM}}$ (ПЦР G12/13X и Q61X)

Значения $Q_{C_{ROX}}$ и $Q_{C_{FAM}}$ для контрольной ПЦР и для ПЦР со смесями G12/13X и Q61X указаны на наклейке на упаковке набора.

Таблица 6. Допустимые значения C_t для контрольных образцов

ПЦР с контрольной смесью		
Образец	Значение $C_{t_{ROX}}$	Значение $C_{t_{FAM}}$
ОКО	$\leq Q_{C_{ROX}}^1$	не определено или $> C_{t_{ПКО}}^2 + 6$
ПКО	Не задано	$\leq Q_{C_{FAM}}$ (контрольная ПЦР) ¹
ПЦР со смесями G12/13X и Q61X		
Образец	Значение $C_{t_{ROX}}$	Значение $C_{t_{FAM}}$
ОКО	Не задано	не определено или $> C_{t_{ПКО}}^2 + 6$
ПКО	Не задано	$\leq Q_{C_{FAM}}$ (ПЦР G12/13X и Q61X) ¹

1) Значения $Q_{C_{ROX}}$ и $Q_{C_{FAM}}$ для контрольной ПЦР и для ПЦР со смесями G12/13X и Q61X указаны на упаковке набора реагентов и в паспорте.

2) $C_{t_{ПКО}}$ – C_t ПКО в этой же постановке ПЦР.

9.1.4 Если величины C_t контрольных образцов выходят за пределы допустимых значений, то необходимо повторить анализ. Если после повторного анализа значения C_t не соответствуют допустимым пределам, то результаты анализа не валидны. Возможные проблемы представлены в таблице 7.

Таблица 7. Другие возможные значения C_t для контрольных образцов и возможные проблемы

ПЦР с контрольной смесью			
Образец	Значение $C_{t_{ROX}}$	Значение $C_{t_{FAM}}$	Возможные проблемы
ОКО	$> Q_{C_{ROX}}$		Возможно наличие ингибиторов или ошибки постановки ПЦР.
		$\leq C_{t_{ПКО}} + 6$	Возможна контаминация.
ПКО		$> Q_{C_{FAM}}$ (контрольная ПЦР)	Возможны ошибки постановки ПЦР, наличие ингибиторов, деградация ПЦР-смеси и/или деградация ПКО.
ПЦР со смесями G12/13X и Q61X			
Образец	Значение $C_{t_{ROX}}$	Значение $C_{t_{FAM}}$	Возможные проблемы
ОКО		$\leq C_{t_{ПКО}} + 6$	Возможна контаминация.
ПКО		$> Q_{C_{FAM}}$ (ПЦР G12/13X и Q61X)	Возможны ошибки постановки ПЦР, наличие ингибиторов, деградация ПЦР-смеси и/или деградация ПКО.

9.1.5 Для каждого клинического образца в контрольной ПЦР должно наблюдаться нарастание флуоресценции по каналу FAM и определяться значение C_t (C_{tC}).

9.1.6 Если значение C_{tC} определяется в диапазоне $C_{tПКО}-4 \leq C_{tC} \leq C_{tПКО}+4$, то концентрация ДНК оптимальна для анализа на наличие мутаций гена *NRAS*.

9.1.7 Если значение C_{tC} меньше $C_{tПКО}-4$, то необходимо развести ДНК, принимая, что двукратное разведение увеличивает C_t на 1 цикл, и повторить анализ.

9.1.8 Если значение C_{tC} больше $C_{tПКО}+4$, то концентрация ДНК не достаточна для анализа на наличие мутаций гена *NRAS*. Необходимо провести повторный анализ, начиная с этапа выделения ДНК из срезов FFPE опухолевой ткани.

9.2 Анализ результатов ПЦР на наличие мутаций гена *NRAS*

9.2.1 Для каждого клинического образца рассчитать значения

$\Delta C_{tG12/13X} = C_{tG12/13X} - C_{tC}$ и $\Delta C_{tQ61X} = C_{tQ61X} - C_{tC}$, где C_{tC} – C_t образца в контрольной ПЦР, $C_{tG12/13X}$ – C_t образца в ПЦР со смесью G12/13X, C_{tQ61X} – C_t образца в ПЦР со смесью Q61X. Рекомендации по расчёту ΔC_t в программе «MS Office Excel» приведены в приложении В.

9.2.2 Сравнить значение $\Delta C_{tG12/13X}$ образцов ДНК со значением первой точки отсечения ($TO_{G12/13X}$), сравнить значение ΔC_{tQ61X} образцов ДНК со значением второй точки отсечения (TO_{Q61X}). Значения $TO_{G12/13X}$ и TO_{Q61X} указаны на упаковке набора.

9.2.3 Образец учитывается как положительный (содержащий мутацию в 12-м или 13-м кодонах гена *NRAS*), если для обоих дублей значения $\Delta C_{tG12/13X}$ меньше или равны значению $TO_{G12/13X}$. Образец учитывается как положительный (содержащий мутацию в 61-м кодоне гена *NRAS*), если для обоих дублей значения ΔC_{tQ61X} меньше или равны значению TO_{Q61X} .

9.2.4 Образец учитывается как отрицательный (без мутаций в 12-м и 13-м кодонах гена *NRAS* или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения), если для обоих дублей значения $\Delta C_{tG12/13X}$ больше $TO_{G12/13X}$, или в ПЦР со смесью G12/13X значение $C_{tG12/13X}$ не определено. Образец учитывается как отрицательный (без мутаций в 61-м кодоне гена *NRAS* или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения), если для обоих дублей значения ΔC_{tQ61X} больше TO_{Q61X} , или в ПЦР со смесью Q61X значение C_{tQ61X} не определено.

9.2.5 Если для одного из дублей значение $\Delta Ct_{G12/13X}$ меньше или равно $TO_{G12/13X}$ (или ΔCt_{Q61X} меньше или равно TO_{Q61X}), а для другого дубля $\Delta Ct_{G12/13X}$ больше $TO_{G12/13X}$ (или ΔCt_{Q61X} больше TO_{Q61X}), то результат считают сомнительным и анализ повторяют. Если в повторном анализе получают сомнительный результат, то проводят макродиссекцию участков опухоли из срезов FFPE опухолевой ткани так, чтобы содержание опухолевых клеток было не менее 50%, выделяют ДНК и повторяют анализ.

10 Условия хранения, транспортирования и эксплуатации

10.1 Условия хранения

10.1.1 Хранить набор реагентов при температуре от минус 18°C до минус 25°C в течение всего срока годности в холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим, не допуская проникновения света.

10.1.2 Не подвергать набор реагентов замораживанию и размораживанию более трёх раз, общее время нахождения после оттаивания при температуре 22°C – не более 30 минут.

10.1.3 Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска или 3 месяца после первого вскрытия упаковки набора в зависимости от того, какая дата наступит раньше.

10.2 Условия транспортирования

10.2.1 Транспортировать набор реагентов следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре не выше минус 18°C.

10.2.2 Допускается транспортирование набора реагентов в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы (ХТЛ-4, ООО «Термологика» или аналогичные).

10.2.3 Срок транспортирования – не более 5 суток.

10.2.4 При транспортировании необходимо соблюдать условия, обеспечивающие сохранность набора реагентов от механического повреждения, неблагоприятного воздействия температуры окружающей среды, воздействия солнечного света.

ВНИМАНИЕ! Если реагенты прибыли незамороженными или упаковка повреждена, пожалуйста, свяжитесь с производителем ООО «БиоЛинк» (см. раздел 11).

10.3 Условия эксплуатации

10.3.1 Использовать набор реагентов при комнатной температуре (от 18°C до 25°C).

10.3.2 Строго соблюдать требования данной инструкции по применению набора реагентов.

10.3.3 Не использовать набор реагентов после истечения срока годности.

11 Гарантийные обязательства

11.1 Производитель гарантирует соответствие качества набора реагентов требованиям нормативной и технической документации при соблюдении условий хранения, транспортирования и применения. Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.2 Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действий третьих лиц, либо обстоятельств непреодолимой силы.

11.3 В случае нарушения условий транспортирования, обнаружения повреждений упаковки, а также по вопросам, касающимся качества набора реагентов, следует обратиться к производителю ООО «БиоЛинк».

Адрес: 630090, г. Новосибирск, ул. Николаева, д. 13
Телефон: +7 (383) 209-32-40
Электронная почта: info@biolinklab.ru
Веб-сайт: biolinklab.ru

12 Маркировка

Маркировка потребительской упаковки содержит следующие графические символы.

	Содержимого достаточно для проведения указанного количества реакций		Номер по каталогу
	Температурный диапазон (условия хранения и транспортирования)		Номер серии
	Не допускать воздействия солнечного света		Дата изготовления (месяц, год)
	Обратитесь к инструкции по применению		Использовать до (месяц, год)
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Изготовитель

Библиография

1. Comparative Analysis of Individual RAS Mutations in Cancer Biology / C. Muñoz-Maldonado, Y. Zimmer, M. Medová // Front Oncol. – 2019. – Vol 9:1088. – P. 1-22. – DOI: 10.3389/fonc.2019.01088
2. My Cancer Genome | Genetically Informed Cancer Medicine [Электронный ресурс]: клиническое значение молекулярных маркёров – Электрон. дан. – [S. 1.] – Режим доступа: <https://www.mycancergenome.org/content/gene/nras/> – Загл. с экрана.
3. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. / J. Y. Douillard, K. S. Oliner, S. Siena, et al. // N Engl J Med. – 2013 – Vol. 369 (11). – P. 1023-34. – DOI: 10.1056/NEJMoa1305275
4. Extended RAS Gene Mutation Testing in Metastatic Colorectal Carcinoma to Predict Response to Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody Therapy: American Society of Clinical Oncology Provisional Clinical Opinion Update 2015 / C. J. Allegra, R. B. Rumble, S. R. Hamilton, et al. // J Clin Oncol. – 2016. – Vol. 34, N 2. – P. 179-85. – DOI: 10.1200/JCO.2015.63.9674
5. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. / E. Van Cutsem, A. Cervantes, B. Nordlinger, D. Arnold, ESMO Guidelines Working Group // Ann Oncol. – 2014. – Vol. 25. – Suppl. 3. – P. iii1-9. – DOI: 10.1093/annonc/mdu260
6. Клинические рекомендации Рак прямой кишки / Министерство Здравоохранения РФ // Год утверждения (частота пересмотра): 2020. – ID: KP554/1. – 100 с.

Приложение А (справочное) Список мутаций 12-го, 13-го и 61-го кодона гена *NRAS* согласно базе данных COSMIC

Экзон	Кодон	Мутация (замена нуклеотида)	Мутация (замена аминокислоты)	ID мутации в COSMIC
2	12	c.35G>A	p.G12D	564
		c.34G>A	p.G12S	563
		c.34G>T	p.G12C	562
		c.35G>T	p.G12V	566
		c.35G>C	p.G12A	565
		c.34G>C	p.G12R	561
		c.34_35GG>AA	p.G12N	12723
		c.36T>C	p.G12G	567
		c.34_35GG>CC	p.G12P	559
		c.34_35GG>TA	p.G12Y	560
	13	c.38G>A	p.G13D	573
		c.37G>C	p.G13R	569
		c.38G>T	p.G13V	574
		c.37G>T	p.G13C	570
		c.38G>C	p.G13A	575
		c.37G>A	p.G13S	571
		c.39T>C	p.G13G	576
		c.37_38GG>AA	p.G13N	24668
		c.37_38GG>TA	p.G13Y	568
		c.38_39GT>TC	p.G13V	572
3	61	c.182A>G	p.Q61R	584
		c.181C>A	p.Q61K	580
		c.182A>T	p.Q61L	583
		c.183A>T	p.Q61H	585
		c.183A>C	p.Q61H	586
		c.182A>C	p.Q61P	582
		c.181C>G	p.Q61E	581
		c.183A>G	p.Q61Q	587
		c.181_182CA>AG	p.Q61R	579
		c.181_182CA>TT	p.Q61L	12725
		c.182_183AA>TG	p.Q61L	30646
		c.182_183AA>GG	p.Q61R	33693
		c.181_183CAA>AAG	p.Q61K	53223
		c.183_184AG>CA	p.Q61_E62>HK	26494

Приложение Б (рекомендуемое) Рекомендации по выделению ДНК из парафиновых блоков

Для выделения ДНК из FFPE блоков излишки парафина обрезать скальпелем и приготовить серийные срезы толщиной 5 микрон с площадью ткани на срезе 25-80 мм². Если поверхность блока была длительное время экспонирована на воздухе, то первые 2-3 среза отбросить, а последующие пять использовать для выделения ДНК.

Первый или последний рабочие срезы серии окрасить гематоксилин-эозином, после чего патоморфолог оценивает процент опухолевых клеток. Если на срезе менее 30% опухолевых клеток, то провести макродиссекцию. Рабочие срезы поместить в пробирку объемом 1,5 мл и выделить ДНК с помощью набора реагентов для выделения ДНК из FFPE ткани, зарегистрированного в РФ.

Приложение В (рекомендуемое) Рекомендации по анализу данных в программе «MS Office Excel»

Для удобства анализа экспортировать таблицу данных в программу «MS Office Excel».

Открыть файл. В столбце «Target» ввести следующие обозначения: «контроль» в ячейки, соответствующие ПЦР с контрольной смесью, «G12/13X» в ячейки, соответствующие ПЦР со смесью G12/13X, «Q61R» в ячейки, соответствующие ПЦР со смесью Q61R (рисунок В1, элемент 1).

Добавить новый столбец «Ct_C», где Ct_C – Ct образца в контрольной ПЦР (рисунок В1, элемент 4). Значения Ct в контрольной ПЦР скопировать в столбце «Cq» и вставить в столбец «Ct_C» (рисунок В1, элемент 4), таким образом, чтобы значения Cq и Ct_C для каждого образца находились в одной строке, соответствующей этому образцу.

Добавить столбец «ΔCt». Используя функцию вычитания, для каждого образца рассчитать разницу $\Delta Ct = Cq - Ct_C$ (рисунок В1, элемент 5), что соответствует $\Delta Ct_{G12/13X} = Ct_{G12/13X} - Ct_C$ и $\Delta Ct_{Q61X} = Ct_{Q61X} - Ct_C$, где Ct_{G12/13X} – Ct образца в ПЦР со смесью G12/13X, Ct_{Q61X} – Ct образца в ПЦР со смесью Q61X.

Добавить столбец «ТО», внести значения TO_{G12/13X} и TO_{Q61X}, указанные на наклейке на упаковке набора (рисунок В1, элемент 6).

Добавить столбец «результат» (рисунок В1, элемент 7).

Сравнить значение $\Delta Ct_{G12/13X}$ образцов ДНК со значением первой точки отсечения (TO_{G12/13X}), сравнить значение ΔCt_{Q61X} образцов ДНК со значением второй точки отсечения (TO_{Q61X}).

Образец учитывается как положительный (содержащий мутацию в 12-м или 13-м кодонах гена *NRAS*), если для обоих дублей значение $\Delta Ct_{G12/13X}$ меньше или равно значению TO_{G12/13X}. Образец учитывается как положительный (содержащий мутацию в 61-м кодоне гена *NRAS* в гене *NRAS*), если для обоих дублей значение ΔCt_{Q61X} меньше или равно значению TO_{Q61X}.

Образец учитывается как отрицательный (без мутаций в 12-м и 13-м кодонах гена *NRAS* или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения), если для обоих дублей $\Delta Ct_{G12/13X}$ больше TO_{G12/13X}, или если в ПЦР со смесью G12/13X значение Ct_{G12/13X} не определено. Образец учитывается как отрицательный (без мутаций в 61-м кодоне гена *NRAS* или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения), если для обоих дублей ΔCt_{Q61X} больше TO_{Q61X}, или если в ПЦР со смесью Q61X значение Ct_{Q61X} не определено.

1	2	3	4	5	6	7
Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev	Result
контроль	NTC-01	ОКО	nd	0.0	0.0	
контроль	NTC-01	ОКО	nd	0.0	0.0	
контроль	Pos Ctrl-01	ПКО	17.3	17.3	0.0	
контроль	Pos Ctrl-01	ПКО	17.3	17.3	0.0	
контроль	Unkn-01	ДНК1	20.1	20.4	0.5	
контроль	Unkn-01	ДНК1	20.8	20.4	0.5	
контроль	Unkn-04	ДНК2	19.1	19.4	0.5	
контроль	Unkn-04	ДНК2	19.8	19.4	0.5	
контроль	Unkn-13	ДНК3	16.4	16.4	0.0	
контроль	Unkn-13	ДНК3	16.5	16.4	0.0	
контроль	Unkn-15	ДНК4	15.2	15.6	0.6	
контроль	Unkn-15	ДНК4	16.0	15.6	0.6	
контроль	Unkn-16	ДНК5	16.5	16.7	0.3	
контроль	Unkn-16	ДНК5	16.9	16.7	0.3	
G12/13X	NTC-02	ОКО	nd	0.0	0.0	
G12/13X	NTC-02	ОКО	nd	0.0	0.0	
G12/13X	Pos Ctrl-02	ПКО	22.3	22.2	0.2	
G12/13X	Pos Ctrl-02	ПКО	22.1	22.2	0.2	
G12/13X	Unkn-05	ДНК1	nd	0.0	0.0	20.1 #3HAC! 7.0 отрицательный
G12/13X	Unkn-05	ДНК1	nd	0.0	0.0	20.8 #3HAC! 7.0 отрицательный
G12/13X	Unkn-08	ДНК2	nd	0.0	0.0	19.1 #3HAC! 7.0 отрицательный
G12/13X	Unkn-08	ДНК2	39.1	39.1	0.0	19.8 19.3 7.0 отрицательный
G12/13X	Unkn-17	ДНК3	27.3	27.7	0.6	16.4 10.9 7.0 отрицательный
G12/13X	Unkn-17	ДНК3	28.1	27.7	0.6	16.5 11.6 7.0 отрицательный
G12/13X	Unkn-19	ДНК4	26.9	26.7	0.4	15.2 11.7 7.0 отрицательный
G12/13X	Unkn-19	ДНК4	26.4	26.7	0.4	16.0 10.4 7.0 отрицательный
G12/13X	Unkn-20	ДНК5	17.5	17.4	0.0	16.5 0.9 7.0 положительный
G12/13X	Unkn-20	ДНК5	17.4	17.4	0.0	16.9 0.5 7.0 положительный
Q61R	NTC-03	ОКО	nd	0.0	0.0	
Q61R	NTC-03	ОКО	nd	0.0	0.0	
Q61R	Pos Ctrl-03	ПКО	21.1	21.0	0.1	
Q61R	Pos Ctrl-03	ПКО	21.0	21.0	0.1	
Q61R	Unkn-09	ДНК1	nd	0.0	0.0	20.1 #3HAC! 6.0 отрицательный
Q61R	Unkn-09	ДНК1	nd	0.0	0.0	20.8 #3HAC! 6.0 отрицательный
Q61R	Unkn-12	ДНК2	23.7	23.9	0.3	19.1 4.6 6.0 положительный
Q61R	Unkn-12	ДНК2	24.0	23.9	0.3	19.8 4.3 6.0 положительный
Q61R	Unkn-21	ДНК3	25.2	25.6	0.5	16.4 8.8 6.0 отрицательный
Q61R	Unkn-21	ДНК3	26.0	25.6	0.5	16.5 9.5 6.0 отрицательный
Q61R	Unkn-23	ДНК4	15.8	15.9	0.0	15.2 0.6 6.0 положительный
Q61R	Unkn-23	ДНК4	15.9	15.9	0.0	16.0 -0.1 6.0 положительный
Q61R	Unkn-24	ДНК5	25.4	25.3	0.1	16.5 8.8 6.0 отрицательный
Q61R	Unkn-24	ДНК5	25.2	25.3	0.1	16.9 8.3 6.0 отрицательный

Рисунок В1. Обработка данных в программе «MS Office Excel»

- 1 – в столбце «Target» обозначены ячейки, соответствующие ПЦР с контрольной смесью, со смесью G12/13X, со смесью Q61R.
- 2 – в столбце «Sample» обозначены номера образцов ДНК, ОКО, ПКО.
- 3 – столбец «Cq», откуда скопированы значения Ct образцов в контрольной ПЦР.
- 4 – столбец Ct_C, в который вставлены значения Ct из столбца «Cq».
- 5 – вычисление значений ΔCt_{G12/13X} и ΔCt_{Q61X} по формуле $\Delta Ct = Cq - Ct_C$
- 6 – значения TO_{G12/13X} и TO_{Q61X} (указаны на наклейке на упаковке набора реагентов).
- 7 – результат анализа на наличие мутации.

В приведённом примере (рисунок В1) значение $TO_{G12/13X} = 7.0$, $TO_{Q61X} = 6.0$.

Образцы ДНК1 и ДНК3 учитываются как отрицательные, то есть, не содержат мутации в 12-м, 13-м и 61-м кодонах гена *NRAS* или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения, поскольку

– для образца ДНК1 в ПЦР со смесью G12/13X значение $Ct_{G12/13X}$ не определено, в ПЦР со смесью Q61X значение Ct_{Q61X} не определено,

– для образца ДНК3 для обоих дублей $\Delta Ct_{G12/13X} > TO_{G12/13X}$ и $\Delta Ct_{Q61X} > TO_{Q61X}$.

Образец ДНК5 учитывается как положительный, содержащий мутацию в 12-м или 13-м кодонах гена *NRAS*, так как для этого образца для обоих дублей $\Delta Ct_{G12/13X} < TO_{G12/13X}$.

Образцы ДНК2 и ДНК4 учитываются как положительные, содержащие мутацию в 61-м кодоне гена *NRAS*, поскольку для обоих дублей значения $\Delta Ct_{Q61X} < TO_{Q61X}$.

Производитель: ООО «БиоЛинк»

Адрес: 630090, г. Новосибирск, ул. Николаева, д. 13

Телефон: (383) 209-32-40

E-mail: info@biolinklab.ru

Веб-сайт: biolinklab.ru